

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-57173

(P2003-57173A)

(43)公開日 平成15年2月26日(2003.2.26)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 21/27

33/543

識別記号

5 9 5

F I

G 0 1 N 21/27

33/543

データコード\*(参考)

C 2 G 0 5 9

5 9 5

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 15 頁)

(21)出願番号 特願2001-242668(P2001-242668)

(22)出願日 平成13年8月9日(2001.8.9)

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 宗林 孝明

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社内

(72)発明者 磯村 哲

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社内

(74)代理人 100092978

弁理士 真田 有

Fターム(参考) 2C059 AA01 BB12 CC16 EED2 GG01

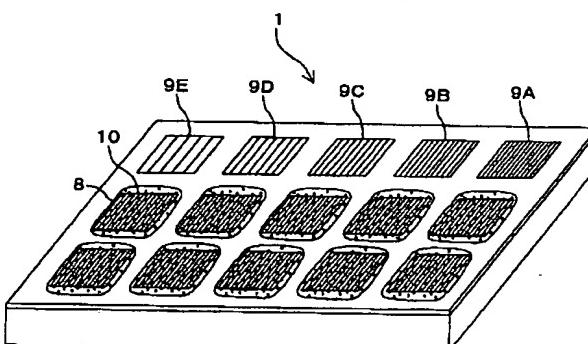
JJ05 KK04 NN06 PP01

(54)【発明の名称】 表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析方法及び分析装置、並びに表面プラズモン共鳴センサチップ

(57)【要約】

【課題】 回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いた試料の分析において、センサチップの傾きによる検出シグナルの誤差を容易に補正できるようにして正確な濃度分析を可能にする。

【解決手段】 表面プラズモン共鳴センサチップ1のセンサ面1aに形成された共鳴領域8, 9A～9Eのうち一部領域9A～9Eを試料中の検出種と特異的に結合する結合物質10を固定化しない特定領域として設け、結合物質10が固定化された反応領域8からのシグナルとともに特定領域9A～9Eから得られるシグナルを用いて分析を行う。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成され、上記共鳴領域のうちの一部反応領域に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された表面プラズモン共鳴センサチップを用いて行う試料の分析方法であって、  
上記センサ面に試料を接触させて光を照射する照射ステップと、  
上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第1検出ステップと、  
上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第2検出ステップと、  
所定の標準条件下における上記特定領域での上記共鳴現象に相關する標準シグナルと今回検出された上記特定領域に対応するシグナルとの比較に基づいて今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを補正する補正ステップと、  
補正された上記反応領域に対応するシグナルに基づき上記試料中の検出種の濃度を演算する濃度演算ステップとを備えたことを特徴とする、表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析方法。

【請求項2】 上記特定領域が複数箇所設けられた表面プラズモン共鳴センサチップを用い、  
上記補正ステップにおいては、各特定領域に対応する標準シグナルと今回検出された各特定領域に対応するシグナルとの比較に基づいて今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを補正することを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析方法。

【請求項3】 上記の各特定領域が同一条件下においてそれぞれ異なるシグナルを示すように形成された表面プラズモン共鳴センサチップを用い、

上記補正ステップにおいては、各特定領域に対応する標準シグナルと今回検出された各特定領域に対応するシグナルとに基づいて上記標準条件下で得られるシグナルと今回の条件下で得られるシグナルとの対応関係を求め、上記対応関係に基づいて今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを補正することを特徴とする、請求項2記載の表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析方法。

【請求項4】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の

表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成され、上記共鳴領域のうちの一部反応領域に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された表面プラズモン共鳴センサチップを用いて行う試料の分析方法であって、  
上記センサ面に試料を接触させて光を照射する照射ステップと、  
上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第1検出ステップと、  
上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第2検出ステップと、  
予め記憶された上記反応領域に対応するシグナルが上記特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の濃度情報と、今回検出された上記反応領域に対応するシグナルと上記特定領域に対応するシグナルとの対応関係に基づき現在の上記試料中の検出種の濃度を演算する濃度演算ステップとを備えたことを特徴とする、表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析方法。

【請求項5】 上記特定領域が複数箇所設けられ、且つ各特定領域が同一条件下においてそれぞれ異なるシグナルを示すように形成された表面プラズモン共鳴センサチップを用い、

上記反応領域に対応するシグナルが上記各特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の各濃度に関する情報を予め記憶しておき、

上記濃度演算ステップにおいては、今回検出された上記各特定領域に対応するシグナルと予め記憶された上記各特定領域に対応する濃度情報に基づいて検量線を作成し、上記検量線に今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを照合することにより現在の上記試料中の検出種の濃度を演算することを特徴とする、請求項4記載の表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析方法。

【請求項6】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成され、上記共鳴領域のうちの一部反応領域に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された表面プラズモン共鳴センサチップと、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において上記センサ面に向けて光を

照射する光照射手段と、  
上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、  
上記受光手段により受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第1シグナル検出手段と、  
上記受光手段により受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第2シグナル検出手段と、  
所定の標準条件下における上記特定領域での上記共鳴現象に相關する標準シグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとの比較に基づいて上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを補正する補正手段と、  
上記補正手段により補正されたシグナルに基づき上記試料中の検出種の濃度を演算する濃度演算手段とを備えたことを特徴とする、表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析装置。

【請求項7】 上記表面プラズモン共鳴センサチップに上記特定領域が複数箇所設けられ、  
上記補正手段は、各特定領域に対応する標準シグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとの比較に基づいて上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを補正するように構成されていることを特徴とする、請求項6記載の表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析装置。

【請求項8】 上記の各特定領域は同一条件下においてそれぞれ異なるシグナルを示すように形成され、  
上記補正手段は、各特定領域に対応する標準シグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとにに基づいて上記標準条件下で得られるシグナルと今回の条件下で得られるシグナルとの対応関係を求め、上記対応関係に基づいて上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを補正するように構成されていることを特徴とする、請求項7記載の表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析装置。

【請求項9】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じる共鳴領域が上記センサ面に形成され、上記共鳴領域のうちの一部反応領域に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された表面プラズモン共鳴センサチップと、  
上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、  
上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において上記センサ面に向けて光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、  
上記受光手段により受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第1シグナル検出手段と、  
上記受光手段により受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第2シグナル検出手段と、  
上記反応領域に対応するシグナルが上記特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の濃度を予め記憶した記憶手段と、  
上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとの対応関係と上記記憶手段に記憶された上記特定領域に対応する濃度情報に基づき現在の上記試料中の検出種の濃度を演算する濃度演算手段とを備えたことを特徴とする、表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析装置。

【請求項10】 上記表面プラズモン共鳴センサチップに上記特定領域が複数箇所設けられるとともに、各特定領域は同一条件下においてそれぞれ異なるシグナルを示すように形成され、  
上記記憶手段に上記反応領域に対応するシグナルが上記各特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の各濃度に関する情報が予め記憶され、  
上記濃度演算手段は、上記第2シグナル検出手段で検出された上記各特定領域に対応するシグナルと上記記憶手段に記憶された上記各特定領域に対応する濃度情報に基づいて検量線を作成し、上記検量線に上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを照合することにより現在の上記試料中の検出種の濃度を演算するように構成されていることを特徴とする、請求項9記載の表面プラズモン共鳴を利用した試料の分析装置。

【請求項11】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じる共鳴領域が上記センサ面に形成された表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、  
試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された反応領域と、

所定の標準条件下において照射された照射光の入射波長と上記共鳴現象が生じる入射角度との間に所定の対応関係を生じさせ、且つ、照射光の照射領域に応じて異なる対応関係を生じさせるように形成された標準領域とを上記共鳴領域に備えたことを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項12】 上記標準領域内に設けられた上記回折格子の形状、及び上記金属層の厚み、材質のうち少なくとも一つの要素を領域に応じて変更することにより、上

記の異なる対応関係を照射光の照射領域に応じて生じさせるように構成されたことを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項13】 上記標準領域が独立した複数の標準スポットからなり、上記標準スポット毎に上記の少なくとも一つの要素が変更されていることを特徴とする、請求項12記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項14】 上記標準領域が連続した単一の領域からなり、上記標準領域上の位置に応じて上記の少なくとも一つの要素が変更されていることを特徴とする、請求項12記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、表面プラズモン共鳴(SPR)を利用した試料の分析方法及び分析装置に関する、特に、回折格子型のセンサチップ(表面プラズモン共鳴センサチップ)を用いた分析方法及び分析装置に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】 従来、生化学や医療検査等の分野においては、化学種、生化学種又は生物種等の検出種を含む試料流体の定量的及び又は定性的な分析方法として、表面プラズモン共鳴(SPR)を利用した分析方法が知られている。表面プラズモン共鳴は、金属層に光が入射した場合に金属表面に誘起される表面プラズモン波が入射光により生成されたエバネッセント波に共鳴して励起される現象である。表面プラズモン共鳴は入射光の波長及び角度に依存しており、表面プラズモン共鳴が励起されたときには、特定の入射角又は特定の波長を有する光成分の光エネルギーが表面プラズモン波へ移行することにより、対応する入射角又は波長を有する反射光が大きく減少するという特徴がある。

【0003】 表面プラズモン共鳴を起こすためには、特定の表面プラズモン波を有する金属と、表面プラズモン波と共にエバネッセント波を誘起する光学構造が必要となる。エバネッセント波を誘起する光学構造としては現在二つの構造が知られている。一つはプリズムの全反射を利用した光学構造であり、もう一つは回折格子を利用した光学構造である。なお、上記の金属にこれらの光学構造を組み合わせた素子は一般に表面プラズモン共鳴センサチップ(以下、単にセンサチップという)と呼ばれている。

【0004】 このようなセンサチップのうち、回折格子型のセンサチップは、通常、図10に示すように表面に凹凸形状(グレーティング)103を有する透明基体101上に金属層102を積層された構造になっている。凹凸形状103上に金属層102が積層されることで金属層102の表面にも凹凸形状104が現れ、この金属層102の表面の凹凸形状104が回折格子として機能する。この回折格子104が形成された金属層102の

表面には、特定の検出種と相互作用して特異的に結合する結合物質(リガンド、分子認識素子)106が塗布されて固定化される。

【0005】 図10に示すような回折格子型のセンサチップ100において、照射光の照射により金属層102に誘起される表面プラズモン波は、その波数を  $k_{sp}$  [ $k_{sp} = 2\pi/\lambda_{sp}$  (波長)] すると、次の式(数1)で表される。

##### 【0006】

##### 【数1】

$$k_{sp}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\omega)n_1(\omega)^2}{\epsilon_m(\omega) + n_1(\omega)^2}}$$

【0007】 また、回折格子104の作用により生じるエバネッセント波は、その波数を  $k_{ev}$  [ $k_{ev} = 2\pi/\lambda_{ev}$  (波長)] すると、次の式(数2)で表される。

##### 【0008】

##### 【数2】

$$k_{ev}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sin \theta + m k_g$$

【0009】 なお、数1或いは数2において、 $\omega$ は照射光の各振動数、 $\theta$ は照射光の入射角、 $k_g$ は回折格子104の格子定数、 $m$ は回折格子104による回折光の回折次数、 $\epsilon_m(\omega)$ は金属層102の誘電率、 $n_1(\omega)$ は金属層102の表面の媒質の屈折率を示している。上記の数1、数2の関係を同一のグラフ上に表したもののが図11に示す分散関係図である。図中、曲線A1、A2は照射光の各振動数 $\omega$ と表面プラズモン波の波数 $k_{sp}$ との関係を示している。数1から明らかなように表面プラズモン波は金属層102の表面の媒質の屈折率に依存していることから、仮に媒質の屈折率が大きくなると照射光の各振動数 $\omega$ と表面プラズモン波の波数 $k_{sp}$ との関係は例えば曲線A1から曲線A2へと変化することになる。

【0010】 一方、図中、直線B1、B2は照射光の各振動数 $\omega$ とエバネッセント波の波数 $k_{ev}$ との関係を示している。数2から明らかなように照射光の各振動数 $\omega$ とエバネッセント波の波数 $k_{ev}$ との関係は入射角度 $\theta$ により変化することから、仮に入射角度 $\theta$ が大きくなると照射光の各振動数 $\omega$ とエバネッセント波の波数 $k_{ev}$ との関係は例えば直線B1から直線B2へと変化することになる。

【0011】 図11中、上記の曲線A1或いはA2と直線B1或いは直線B2との交点が表面プラズモン共鳴が起きる共鳴点を示し、その共鳴点に対応する波長及び入射角が共鳴波長及び共鳴角度となる。この共鳴点では反射光の強度は極小値を示す。上記のように結合物質106が固定化された金属層102の表面に試料を接触させることにより、結合物質106に試料中の検出種が捕捉されるが、結合物質106に検出種が捕捉されると金属

層102の表面の媒質の屈折率が変化する。そして、この屈折率の変化の程度は、結合物質106に捕捉される検出種の物質量、すなわち試料中の検出種の濃度の変化に対応していることから、表面プラズモン共鳴が起きる共鳴波長及び共鳴角度を調べることで、試料中の検出種の濃度を分析することができる。具体的には、予め検出種の濃度と共鳴波長及び共鳴角度との関係を示す検量線を作成しておき、検出された共鳴波長及び共鳴角度をこの検量線に当てはめることで検出種の濃度を分析することができる。

【0012】共鳴点を検出する方法としては、入射角度を変えずに入射波長を変化させる方法（波長スキャン）と入射波長を変えずに入射角度を変化させる方法（角度スキャン）の何れかの方法が一般的である。例えば、表面プラズモン波の特性曲線が曲線A2にあり、照射光の入射波長及び入射角度の初期値が点P1に対応している場合には、波長スキャンでは、図11中に矢印C1で示すように波長（角振動数 $\omega$ ）を直線B1に沿って変化させていきながら反射光の強度を測定することにより、共鳴点P2を検出することができる。また、角度スキャンでは、図11中に矢印C2で示すように波長（角振動数 $\omega$ ）を一定とし、入射角度 $\theta$ を変化させて直線B1の傾きを変化させていきながら反射光の強度を測定することにより、共鳴点P3を検出することができる。

#### 【0013】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、図12(a)に示すようにセンサチップ100が垂直方向に傾いている場合、実際のセンサチップ100への照射光の入射角度は水平面に対する入射角度 $\theta$ にセンサチップ100の傾き角度 $\beta$ を加えた角度となる。この場合は、図12(b)に示すようにエバネッセント波の特性線Bの傾きが変化てしまい、表面プラズモン波との共鳴点がずれてしまう。

【0014】また、図13(a)に示すようにセンサチップ100が照射光の照射方向に対して水平面内で傾いている場合には、見かけの回折格子104のピッチは、傾き角度 $\alpha$ の分だけ実際のピッチ $\rho$ よりも広がってしまう。この場合は、数1における回折格子104の格子定数 $k_g$ が変化するため、図13(b)に示すようにエバネッセント波の特性線Bが平行移動してしまい、表面プラズモン波との共鳴点がずれてしまう。

【0015】このため、センサチップ100が垂直方向にも水平面内でも傾いていないものと仮定して共鳴波長や共鳴角度を検出したのでは、これらの検出シグナルにセンサチップ100の傾きに伴う誤差が含まれてしまうため、試料中の検出種の濃度を正確に分析することはできない。このようなセンサチップ100の傾きの影響を排除する方法としては、センサチップ100の垂直方向への傾き角度 $\beta$ や水平面内での傾き角度 $\alpha$ を考慮して検出値を補正することが考えられる。しかしながら、通

常、検出シグナルに誤差があるとしても、それが垂直方向への傾き角度 $\beta$ によるものなのか、水平面内での傾き角度 $\alpha$ によるものなのか、或いは垂直方向へも水平面内でも傾いている場合に双方どの程度の影響があるのか特定は困難であるため、センサチップ100の傾き角度 $\beta$ 、 $\alpha$ を考慮して検出シグナルの補正を行うことは極めて難しい。

【0016】また、上記の課題とは別に、近年、特開平2000-121551号公報に開示されているように、試料中の検出種の濃度をリアルタイムで測定する技術が提案されている。特開平2000-121551号公報に開示された技術はプリズム型のセンサチップに関するものであるが、濃度未知の試料とともに濃度の異なる複数の濃度既知の試料を別々にセンサ面に接触させた状態で照射光を照射し、濃度既知の試料について表面プラズモン共鳴が生じたときのシグナル（共鳴角度及び共鳴波長）を検出してその検出結果から検量線を作成し、作成した検量線に濃度未知の試料についての検出結果を当てはめることで、濃度未知の試料の濃度をリアルタイムに分析しようとするものである。このようなリアルタイム分析によれば、予め検量線を作成しておく必要がないので、極めて短時間で濃度分析を行うことができるという利点がある。

【0017】しかしながら、この技術では、濃度既知の試料を複数常に備えている必要があるので装置構造が大掛かりになってしまい、簡便にはリアルタイム分析を行うことができない。また、この技術では濃度の異なる複数の試料を収容するための収容部が必要になるが、この技術を回折格子型のセンサチップに転用する場合、回折格子型のセンサチップのセンサ面（金属層102の表面）には、凹凸形状の回折格子104が形成されているため、収容部間のシール性を確保するための何らかの手段が必要になるという課題もある。

【0018】本発明は、このような課題に鑑み創案されたもので、その第1の目的は、回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて行う試料の分析において、センサチップの傾きによる検出シグナルの誤差を容易に補正できるようにして正確な濃度分析を可能にした分析方法及び分析装置を提供することにある。また、その第2の目的は、回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて行う試料の分析において、上記第1の目的を達成するための手段と主要部を共通にする手段によって試料のリアルタイム分析を可能にした分析方法及び分析装置を提供することにある。

【0019】そして、その第3の目的は、上記第1の目的にかかる分析方法及び分析装置、及び第2の目的にかかる分析方法及び分析装置に共通して好適に使用可能な回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを提供することにある。

#### 【0020】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、発明者らは、表面プラズモン共鳴センサチップのセンサ面に形成された共鳴領域のうち一部領域を試料中の検出種と特異的に結合する結合物質を固定化しない特定領域として設け、上記結合物質が固定化された反応領域からのシグナルとともに上記特定領域から得られるシグナルを用いて分析を行うことで、上記の第1の目的及び第2の目的を達成できることを見出し、本発明を完成した。

【0021】まず、上記第1の目的を達成するため、本発明の分析方法（第1の分析方法）は、試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成され、上記共鳴領域のうちの一部反応領域に試料中の検出種（化学種、生化学種又は生物種等）と特異的に結合する結合物質（抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって検出種を捕捉できる物質）が固定化された回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて行う試料の分析方法であって、以下のステップを実行することを特徴としている。

【0022】すなわち、この第1の分析方法では、上記センサ面に試料を接触させて光を照射する照射ステップ、上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相關するシグナル（共鳴波長や共鳴角度等）を検出する第1検出ステップ、上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する第2検出ステップ、所定の標準条件下（例えば垂直方向や水平面内での傾きがゼロの状態）における上記特定領域での上記共鳴現象に相關する標準シグナルと今回検出された上記特定領域に対応するシグナルとの比較に基づいて今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを補正する補正ステップ、補正された上記反応領域に対応するシグナルに基づき上記試料中の検出種の濃度を演算する濃度演算ステップを実行する。

【0023】これにより、上記表面プラズモン共鳴センサチップが垂直方向や水平面内で傾いている場合でも、上記特定領域において所定の標準条件下において得られた標準シグナルと今回検出されたシグナルとの比較に基づいて、上記反応領域に対応するシグナルが補正されるので、傾きによる誤差の影響をうけることなく、上記試料中の検出種の濃度を正確に分析することが可能になる。なお、上記の各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。特に、各ステップを同時に

実行する場合には、リアルタイムでシグナルを補正することができるので、上記表面プラズモン共鳴センサチップの設置状態が不安定で垂直方向や水平面内での傾斜角度が変動しているような場合でも、正確な分析が可能になる。

【0024】上記の第1の分析方法は、以下の構成を有する本発明の分析装置（第1の分析装置）を用いることにより実施することができる。この第1の分析装置は、上記表面プラズモン共鳴センサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、上記保持手段により保持された状態の上記表面プラズモン共鳴センサチップのセンサ面に向けて光照射手段により光を照射し、上記センサ面からの反射光を受光手段により受光するような装置構成を有している。

【0025】そして、さらに上記受光手段により受光した反射光から上記試料を分析するための手段として、第1シグナル検出手段、第2シグナル検出手段、補正手段、及び濃度演算手段を備えている。上記第1シグナル検出手段は、上記受光手段により受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する手段であり、上記第2シグナル検出手段は、上記受光手段により受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相關するシグナルを検出する手段である。また、上記補正手段は、所定の標準条件下における上記特定領域での上記共鳴現象に相關する標準シグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとの比較に基づいて上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを補正する手段であり、上記濃度演算手段は、上記補正手段により補正されたシグナルに基づき上記試料中の検出種の濃度を演算する手段である。

【0026】なお、上記の第1の分析方法において、好ましくは、上記表面プラズモン共鳴センサチップとして上記特定領域が複数箇所設けられた表面プラズモン共鳴センサチップを用いる。そして、上記補正ステップにおいて、各特定領域に対応する標準シグナルと今回検出された各特定領域に対応するシグナルとの比較に基づいて今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを補正するようとする。このように複数の特定領域から得られるシグナルに基づき上記反応領域に対応するシグナルを補正することで、補正の精度を高めてより正確に分析を行うことが可能になる。この場合、上記の第1の分析装置にかかる補正手段は、各特定領域に対応する標準シグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとの比較に基づいて上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを補正するように構成すればよい。

【0027】また、より好ましくは、上記表面プラズモン共鳴センサチップとして上記の各特定領域が同一条件下においてそれぞれ異なるシグナルを示すように形成さ

れた表面プラズモン共鳴センサチップを用いる。そして、上記補正ステップにおいて、各特定領域に対応する標準シグナルと今回検出された各特定領域に対応するシグナルとに基づいて上記標準条件下で得られるシグナルと今回の条件下で得られるシグナルとの対応関係を求め、上記対応関係に基づいて今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを補正するようにする。このように上記標準条件下で得られるシグナルと今回の条件下で得られるシグナルとの対応関係に基づき上記反応領域に対応するシグナルを補正することで、補正の精度をさらに高めることができくなる。この場合、上記の第1の分析装置にかかる補正手段は、各特定領域に対応する標準シグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとに基づいて上記標準条件下で得られるシグナルと今回の条件下で得られるシグナルとの対応関係を求め、上記対応関係に基づいて上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを補正するように構成すればよい。

【0028】一方、上記第2の目的を達成するため、本発明の分析方法（第2の分析方法）は、第1の分析方法と同様に試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成され、上記共鳴領域のうちの一部反応領域に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて行う試料の分析方法であって、以下のステップを実行することを特徴としている。

【0029】すなわち、この第2の分析方法では、上記センサ面に試料を接触させて光を照射する照射ステップ、上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相関するシグナルを検出する第1検出手段、上記センサ面からの反射光を受光し、受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相関するシグナルを検出する第2検出手段、予め記憶された上記反応領域に対応するシグナルが上記特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の濃度情報と、今回検出された上記反応領域に対応するシグナルと上記特定領域に対応するシグナルとの対応関係に基づき現在の上記試料中の検出種の濃度を演算する濃度演算ステップを実行する。

【0030】これにより、上記反応領域に対応するシグナルが示す上記試料中の検出種の濃度が今回検出された上記特定領域に対応するシグナルを利用して演算されるので、濃度既知の試料を用意することなく簡便に試料のリアルタイム分析を行うことが可能になる。なお、上記の各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行し

てもよい。特に、各ステップを同時に実行する場合には、試料中の検出種の濃度変化、すなわち、試料中の検出種が結合物質に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることが可能になる。

【0031】上記の第2の分析方法は、以下の構成を有する本発明の分析装置（第2の分析装置）を用いることにより実施することができる。この第2の分析装置は、上記の第1の分析装置と同様、上記表面プラズモン共鳴センサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、上記保持手段により保持された状態の上記表面プラズモン共鳴センサチップのセンサ面に向けて光照射手段により光を照射し、上記センサ面からの反射光を受光手段により受光するような装置構成を有している。

【0032】そして、さらに上記受光手段により受光した反射光から上記試料を分析するための手段として、第1シグナル検出手段、第2シグナル検出手段、記憶手段、及び濃度演算手段を備えている。上記第1シグナル検出手段は、上記受光手段により受光した反射光のうち上記反応領域からの反射光の強度に基づき、上記反応領域での上記共鳴現象に相関するシグナルを検出する手段であり、上記第2シグナル検出手段は、上記受光手段により受光した反射光のうち上記共鳴領域内で且つ上記反応領域外の特定領域からの反射光の強度に基づき、上記特定領域での上記共鳴現象に相関するシグナルを検出する手段である。また、上記記憶手段は、上記反応領域に対応するシグナルが上記特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の濃度を予め記憶した手段であり、上記濃度演算手段は、上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルと上記第2シグナル検出手段で検出されたシグナルとの対応関係と上記記憶手段に記憶された上記特定領域に対応する濃度情報に基づき現在の上記試料中の検出種の濃度を演算する手段である。

【0033】なお、上記の第2の分析方法において、好みしくは、上記表面プラズモン共鳴センサチップとして上記特定領域が複数箇所設けられ、且つ各特定領域が同一条件下においてそれぞれ異なるシグナルを示すように形成された表面プラズモン共鳴センサチップを用いる。そして、上記反応領域に対応するシグナルが上記各特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の各濃度に関する情報を予め記憶しておき、上記濃度演算ステップにおいて、今回検出された上記各特定領域に対応するシグナルと予め記憶された上記各特定領域に対応する濃度情報に基づいて検量線を作成し、上記検量線に今回検出された上記反応領域に対応するシグナルを当てはめることにより現在の上記試料中の検出種の濃度を演算するようになる。このように検出した上記各特定領域に対応するシグナルに基づき検量線を作成し、作成した検量線を用いて現在の上記試料中の検出種

の濃度を演算することで、より正確なリアルタイム分析が可能になる。この場合、上記の第2の分析装置にかかる記憶手段には、上記反応領域に対応するシグナルが上記各特定領域に対応するシグナルに一致するときの上記試料中の検出種の各濃度に関する情報を予め記憶しておき、上記濃度演算手段は、上記第2シグナル検出手段で検出された上記各特定領域に対応するシグナルと上記記憶手段に記憶された上記各特定領域に対応する濃度情報とに基づいて検量線を作成し、上記検量線に上記第1シグナル検出手段で検出されたシグナルを当てはめることにより現在の上記試料中の検出種の濃度を演算するよう構成すればよい。

【0034】そして、上記第3の目的を達成するため、本発明の表面プラズモン共鳴センサチップは、上記の回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップであって、特に、試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された反応領域に加えて、所定の標準条件下において照射された照射光の入射波長と上記共鳴現象が生じる入射角度との間に所定の対応関係を生じさせ、且つ、照射光の照射領域に応じて異なる対応関係を生じさせるよう形成された標準領域を上記共鳴領域に備えたことを特徴としている。

【0035】このような構成により、上記センサ面に光を照射した場合には、上記標準領域からは照射光の入射条件に応じた所定のシグナルが検出され、且つ、照射光の照射領域に応じて異なるシグナルが検出される。したがって、上記標準領域を上記特定領域として利用することで、上記の第1の分析方法及び分析装置においては、高い精度で上記反応領域に対応するシグナルの誤差を補正することができ、上記の第2の分析方法及び分析装置においては、各照射領域からのシグナルに基づき検量線の作成を可能にしてより正確なリアルタイム分析が可能になる。

【0036】なお、照射光の照射領域に応じて上記の異なる対応関係を生じさせるようにするには、上記標準領域内に設けられた上記回折格子の形状、及び上記金属層の厚み、材質のうち少なくとも一つの要素を領域に応じて変更すればよい。この場合、好ましくは上記標準領域を独立した複数の標準スポットから構成し、上記標準スポット毎に上記の少なくとも一つの要素を変更する。あるいは、上記標準領域を連続した単一の領域から構成し、上記標準領域上の位置に応じて上記の少なくとも一つの要素を変更すればよい。上記回折格子の形状としては、溝ピッチ(周期：凹凸の凸から隣接する凸までの距離)、溝深さ(頂から谷底までの距離)、溝方向等があるが、好ましくは上記回折格子のピッチによって上記対応関係を制御するようにする。

【0037】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

#### (A) 実施形態

まず、図1を用いて本発明の一実施形態にかかるセンサチップ(表面プラズモン共鳴センサチップ)1の構成について説明する。図1に示すように本実施形態にかかるセンサチップ1は、その表面(センサ面)1aを金属層3により被覆され、金属層3上の複数のスポット(測定点)8, 9A～9Eに回折格子6, 7A～7Eが部分的に形成されている。

【0038】この構造によれば、照射光がセンサチップ1のセンサ面1aに照射されると、照射光はセンサ面1a上の回折格子6, 7A～7Eが形成された各個所において回折し、この回折現象によりエバネッセント波が生じる。また、照射光が金属層3に作用することにより金属層3の表面に表面プラズモン波が発生する。そして、特定の波長及び入射角の励起光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴し、表面プラズモン共鳴(SPR)が起きる。すなわち、このセンサチップ1では、金属層3上に回折格子6, 7A～7Eが部分的に形成されている各スポット8, 9A～9Eがそれぞれ共鳴領域となっている。

【0039】これらのスポット8, 9A～9Eのうち、各スポット8には同一形状の回折格子5が同一方向に形成されている。センサチップ1の使用時(試料の分析に用いる際)には、図2に示すように各スポット8上には結合物質10が固定化されて、試料中の検出種(化学種、生化学種又は生物種等)と反応する反応領域となる。結合物質10は、抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって特定の物質と特異的に結合しうる性質を備えた結合物質であり、検出すべき検出種に応じた結合物質10が選択される。試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じた結合物質10がそれぞれ選択され、それぞれ別々のスポット8に固定化される。なお、このとき、結合物質10がスポット8全体を完全に覆うように結合物質10を固定するのがほしい。

【0040】これに対し、スポット9A～9Eにはそれぞれ異なるピッチの回折格子7A～7Eが同一方向に形成されている。ここでは、回折格子7Aのピッチはスポット8の回折格子6と同ピッチであり、以下、回折格子7B, 7C, 7D, 7Eの順にピッチが広くなるように形成されている。また、これらスポット9A～9Eは、本発明にかかる特定領域(標準領域)であり、上記のスポット8とは異なり結合物質10は固定化されていない。以下、これらスポット9A～9Eを標準スポット9A～9Eという。

【0041】ところで、共鳴領域において検出されるシグナル、すなわち共鳴角度及び共鳴波長の大きさは、前述の数2及び図13から明らかのように、同一の入射条件で照射光を照射したときには回折格子のピッチが狭い

ほど小さな値となる。例えば、同一の入射波長で照射光（単色光）を照射する場合には回折格子のピッチが狭いほど共鳴角度が小さくなり、同一の入射角度で照射光（白色光）を照射する場合には回折格子のピッチが狭いほど共鳴波長が小さくなる。回折格子のピッチと検出シグナルの大きさの関係は、結合物質10を固定したスポット8で得られる試料中の検出種の濃度と検出シグナルの大きさの関係と同様、線形関係である。したがって、試料中の検出種の濃度と回折格子のピッチとの間にも間接的には線形関係があると言える。このことから、回折格子のピッチを変えることで、任意の濃度に対応するシグナルを再現することが可能になると考えられる。

【0042】本実施形態では、各標準スポット9A～9Eの回折格子7A～7Eのピッチをそれぞれ異ならせることにより、各標準スポット9A～9Eから得られるシグナルによって種々の濃度に対応するシグナルを再現できるようにしている。図3(a)は、センサチップ1が水平に配置され、且つ照射光の照射方向に対し水平面内での傾きがゼロの状態（標準条件下）において角度スキャンを行い、各標準スポット9A～9Eにおける共鳴角を検出した結果と、同様の標準条件下において試料中の検出種の濃度を変えながら角度スキャンを行い、結合物質10が固定されたスポット8における共鳴角を検出した結果とを示したグラフである。ここでは、試料中の検出種の濃度と共鳴角の関係を検出種の濃度を横軸にして示すとともに、上述した間接的な線形関係に基づき、試料中の検出種の濃度と回折格子のピッチとの関係を検出種の濃度を横軸にして示している。同様に、図3(b)は標準条件下において波長スキャンを行った場合の検出結果であり、試料中の検出種の濃度と共鳴波長の関係を検出種の濃度を横軸にして示すとともに、試料中の検出種の濃度と回折格子のピッチとの関係を検出種の濃度を横軸にして示している。

【0043】上記のセンサチップ1は、以下のような方法により製造することができる。すなわち、図4(a)に示す基体2の表面に、まず、図4(b)に示すようにレーザ加工等により複数箇所に部分的に凹凸形状4、5A～5Eを形成し、次いで、図4(c)に示すように基体2の表面全面にスパッタリングや蒸着により金属層3を積層することで製造することができる。凹凸形状4、5A～5E上に金属層3が積層されることで金属層3の表面にも凹凸形状が現れ、この金属層3の表面の凹凸形状が回折格子6、7A～7Eとして機能する。

【0044】基体2の材質は、表面に凹凸形状4、5A～5Eを形成することができ、金属層3を保持できる機械的強度が十分であるならばその材質に限定はない。凹凸形状4、5A～5Eの形成しやすさからは樹脂が好ましく、アクリル樹脂(ポリメタクリル酸メチルなど)、ポリエステル樹脂(ポリカーボネートなど)などが好適な材質として挙げられる。

【0045】基体2に形成する凹凸形状4、5A～5Eは、金属層3を積層したときにその表面に所望の回折格子6、7A～7Eが得られるように金属層3の厚み等を考慮して形成する。形成方法としては、上述のレーザ加工等の他、射出成型によって基体2とともに成型してもよい。凹凸形状4、5A～5Eとしては、矩形波形状、正弦波形状、鋸歯状形状などがあり得るが、好ましくは回折格子6、7A～7Eの溝深さが10～200nm（より好ましくは30～120nm）、ピッチが400～1200nm（照射光の波長と関係する）の範囲となるような周期的な凹凸形状とする。

【0046】金属層3は、表面プラズモン波を誘起しうるものであればその材質に限定はない。例えば、金、銀、銅、アルミニウムやこれらを含む合金等、或いは銀、銅、アルミニウムの酸化物等を用いることができる。感度や安価な点では銀が好ましいが、安定性の面では金が好ましい。なお、金属層3の厚みは、好ましくは20～300nmとし、より好ましくは30～160nmとする。なお、金属層3の厚みが小さい場合には、照射光が金属層3を透過して基体2の表面に達し、照射光が基体2表面の凹凸形状4、5A～5Eにより回折する場合もある。この場合は凹凸形状4、5A～5Eが回折格子として機能することになる。

【0047】凹凸形状4、5A～5Eが形成された各領域の形状、すなわちスポット8、9A～9Eの形状は、図1に示すような矩形の他、円形、多角形、楕円形等、種々の形状を選択することができるが、スポット8、9A～9Eには形状及び大きさに差がなく、均一なものであることが好ましい。面積に換算した場合には、ばらつきが±10%、好ましくは±2%以内に収まるようにするのが好ましい。

【0048】次に、本実施形態にかかるセンサチップ1の使用方法について説明する。センサチップ1を試料の分析に用いる際には、図2に示すように各スポット8に結合物質10を固定化したものを用いる。そして、このように結合物質10が固定化されたセンサチップ1を図5に示す構成の分析装置20にセットして分析を行う。この分析装置20はセンサチップ1を固定するためのホルダ（保持手段）21、光源（光照射手段）22、光検出器（受光手段）23及び分析部24から主に構成されている。

【0049】ホルダ21には検出種を含む試料流体が通過する流路21aが形成されている。センサチップ1はそのセンサ面1aが流路21aを流れる試料に接するように配置されて固定される。光源22はセンサチップ1のセンサ面1aに向けて照射光を照射するようにセンサチップ1に対して流路21aを挟んで配置されている。光源22は分析の方法に応じて選択され、共鳴角の変位に基づき分析を行う場合には単色光を光源として用い、最大吸収波長（共鳴波長）の変位に基づき分析を行う場

合には白色光を光源として用いる。単色光の光源としては、レーザ光源、特に価格、大きさの点で半導体レーザが好ましく、波長は350～1300nm程度とするのが好ましい。また、ハロゲン・タンクステンランプなどの白色光を干渉フィルタや分光器等で分光して得た単色光を光源として用いることも可能である。一方、白色光の光源としては、ハロゲン・タンクステンランプ、キセノンランプ等が好ましい。

【0050】光検出器23はセンサチップ1からの反射光を検出する検出器であり、光源22同様にセンサチップ1に対して流路21aを挟んで配置され、照射光が回折して生じる回折光のうち0次の回折光（反射光）の方向に向けられている。光検出器23としては、例えばCCD素子を集積したものやシリコンフォトダイオードアレイ等が好ましい。なお、図中では省略しているが、P偏光のみが表面プラズモン波を共鳴させることができるために、光源22とセンサチップ1との間、またはセンサチップ1と光検出器23との間には、光源22からの照射光、或いはセンサチップ1からの反射光を偏光するための偏光子が設置されている。

【0051】分析部24は光検出器23からの検出情報に基づき分析処理を行う装置である。分析部24は、本発明にかかる第1シグナル検出手段、第2シグナル検出手段、補正手段、記憶手段、及び濃度演算手段として機能する。以下、分析部24の各機能とあわせて、本実施形態にかかるセンサチップ1を用いた試料の分析手順について、別途測定により得られた検量線を用いて分析を行う場合と、検量線の作成も測定と同時に実行するリアルタイム分析を行う場合とに分けて具体的に説明する。

【0052】別途測定により得られた検量線を用いて行う分析では、図6に示すフローチャートに沿って処理が行われる。なお、ここでは光源22から照射する照射光は単色光（单一波長の光）であり、照射光のセンサチップ1に対する入射角度を変化させる角度スキャンによって分析が行われるものとする。この場合、まず、センサチップ1をホルダ21にセットしてセンサチップ1のセンサ面1aを試料に接触させる（ステップA1）。これによりセンサ面1aの各スポット8に固定された結合物質10に試料流体中の検出種が特異的に結合する。そして、結合物質10に結合した検出種の物質量に応じて各スポット8の金属層3表面近傍の媒質の屈折率が変化し、各スポット8における表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。一方、結合物質10が固定化されていない標準スポット9A～9Eについては、金属層3表面近傍の媒質の屈折率の変化ではなく、表面プラズモン波の共鳴条件に変化はない。

【0053】次に、光源22からセンサ面1aに向けて照射光を照射する（ステップA2）。ここでは、照射光が全てのスポット8、9A～9Eを照らすように、すなわち全スポット8、9A～9Eが一本の照射光の照射範

囲内に含まれるように照射光の太さを調整する。これにより、全てのスポット8、9A～9Eを同時に測定することができる。センサ面1aに照射された照射光は各スポット8、9A～9Eに形成された回折格子6、7A～7Eにおいて回折光を生じさせる。このうち0次の回折光（反射光）を光検出器23によって検出する（ステップA3）。

【0054】光検出器23により検出された反射光の情報は分析部24に送られる。分析部24は、光検出器23からの反射光の情報から結合物質10が固定された各スポット8からの反射光の情報を抽出して、スポット8毎に反射光の強度が最小となる入射角度、すなわち共鳴角度を検出する。ここでは、分析部24は本発明にかかる第1シグナル検出手段として機能する（ステップA4）。

【0055】また、分析部24は、標準領域である標準スポット9A～9Eからの反射光の情報も抽出し、標準スポット9A～9E毎に反射光の強度が最小となる共鳴角度（参照共鳴角度）を検出する。ここでは、分析部24は本発明にかかる第2シグナル検出手段として機能する（ステップA5）。このようにして得られた各スポット8、9A～9Eの共鳴角度には、センサチップ1の傾斜による誤差が含まれている可能性がある。そこで、分析部24は、ステップA5で検出した各標準スポット9A～9Eの共鳴角度を用いて、ステップA4で検出した各スポット8の共鳴角度を補正する。

【0056】具体的には、標準領域である各標準スポット9A～9Eについては、図3(a)に示すように標準条件下における共鳴角度との関係が既知である。したがって、標準条件下における各標準スポット9A～9Eの共鳴角度を $\theta_{0A}, \theta_{0B}, \theta_{0C}, \theta_{0D}, \theta_{0E}$ とし、今回ステップA5で検出された各標準スポット9A～9Eの共鳴角度を $\theta_A, \theta_B, \theta_C, \theta_D, \theta_E$ とすると、 $(\theta_{0A}, \theta_A), \dots, (\theta_{0E}, \theta_E)$ の5組のデータが得られる。これらのデータから、適当な近似式により標準条件下における共鳴角度と今回検出された共鳴角度との換算式 $f(\theta)$ が求められる。

【0057】この換算式 $f(\theta)$ を用いると、未知のスポットで検出された共鳴角度を $\theta_x$ とすると、そのスポットにおいて標準条件下で検出されるべき共鳴角度 $\theta_{0x}$ は、次式（数3）であらわすことができる。

【0058】

$$[\text{数3}] \quad \theta_{0x} = f^{-1}(\theta_x)$$

分析部24は、各標準スポット9A～9Eの標準条件下での共鳴角度と今回検出された共鳴角度との対応関係から上記の式（数3）を作成し（ステップA6）、この式にステップA4で検出された各スポット8の共鳴角度を当てはめることにより、検出された各スポット8の共鳴角度を標準条件下において各スポット8で検出されるべき共鳴角度に補正する（ステップA7）。以上のステッ

PA6, A7では分析部24は本発明にかかる補正手段として機能する。

【0059】分析部24は、上記のようにして補正した各スポット8の共鳴角度と照射光の波長とを別途測定して得られた検量線（或いは理論的な濃度換算式）に対応させて、各スポット8に対応する検出種の濃度を算出する。ここでは分析部24は本発明にかかる濃度演算手段として機能する（ステップA8）。このような手法により分析を行うことで、センサチップ1が垂直方向や水平面内で傾いている場合でも、標準条件下における標準スポット9A～9Eの共鳴角度（標準シグナル）と今回検出された標準スポット9A～9Eの共鳴角度との比較に基づいて、反応領域である各スポット8の共鳴角度が補正されるので、センサチップ1の傾きによる誤差の影響をうけることなく、試料中の検出種の濃度を正確に分析することが可能になる。

【0060】特に本実施形態では、複数の標準スポット9A～9Eの共鳴角度に基づき各スポット8の共鳴角度を補正し、且つ、同一条件下においてそれぞれ異なる共鳴角度を示すように各標準スポット9A～9Eを形成しているので、標準条件下で得られる共鳴角度と今回の条件下で得られる共鳴角度との対応関係が明確であり、高い精度で補正を行うことができる。

【0061】なお、上記の各ステップA1～A8は、上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。各ステップを同時実行する場合には、リアルタイムで共鳴角度を補正することができるので、仮にセンサチップ1の設置状態が不安定で垂直方向や水平面内の傾斜角度が変動しているような場合でも、正確な分析が可能になる。

【0062】一方、リアルタイム分析では、図7に示すフローチャートに沿って処理が行われる。なお、ここでも光源22から照射する照射光は単色光（単一波長の光）であり、照射光のセンサチップ1に対する入射角度を変化させる角度スキャンによって分析が行われるものとする。また、ステップB1からステップB5までの処理は、上述の別途測定により得られた検量線を用いて行う分析におけるステップA1からステップA5までの処理と同様の内容であるので、ステップB1からステップB5までの処理の説明は省略し、ステップB6から説明する。

【0063】ステップB6では、分析部24は、ステップB5（ステップA5と同じ処理内容）で検出された各標準スポット9A～9Eの共鳴角度と、各標準スポット9A～9Eが示す検出種の濃度とに基づき検量線を作成する。具体的には、各標準スポット9A～9Eが示す検出種の濃度をC<sub>A</sub>, C<sub>B</sub>, C<sub>C</sub>, C<sub>D</sub>, C<sub>E</sub>とし、今回ステップB5で検出された各標準スポット9A～9Eの共鳴角度をθ<sub>A</sub>, θ<sub>B</sub>, θ<sub>C</sub>, θ<sub>D</sub>, θ<sub>E</sub>とすると、(C<sub>A</sub>, θ<sub>A</sub>), ..., (C<sub>E</sub>, θ<sub>E</sub>)の5組のデータが得られ

る。これらのデータから、適当な近似式により今回検出される共鳴角度と検出種の濃度との換算式f(C, θ)が求められる。この換算式f(C, θ)が検量線である。なお、各標準スポット9A～9Eが示す検出種の濃度C<sub>A</sub>, ..., C<sub>E</sub>は、図3(a)の検出種の濃度と回折格子のピッチとの対応関係を示すグラフから求められる。このグラフは予め実験等により作成されて分析部24内の記憶部（記憶手段）に記憶されている。

【0064】上記の換算式f(C, θ)を用いると、未知のスポットで検出された共鳴角度をθ<sub>x</sub>とすると、そのスポットに存在する検出種の濃度C<sub>x</sub>は、次式（数4）であらわすことができる。

#### 【0065】

$$[数4] C_x = f^{-1}(C, \theta_x)$$

分析部24は、この式（数4）にステップB4（ステップA4と同じ処理内容）で検出された各スポット8の共鳴角度を当てはめることにより、各スポット8に対応する検出種の濃度をリアルタイムに算出する（ステップB7）。以上のステップB6, B7では分析部24は本発明にかかる演算手段として機能する。

【0066】このように、スポット8の共鳴角度が各標準スポット9A～9Eの共鳴角度に一致するときの検出種の濃度情報と、今回検出された各スポット8の共鳴角度と各標準スポット9A～9Eの共鳴角度との対応関係とに基づき、現在の検出種の濃度を演算することで、濃度既知の試料を用意することなく簡便に試料のリアルタイム分析を行うことが可能になる。

【0067】特に本実施形態では、同一条件下においてそれぞれ異なる値を示す複数の標準スポット9A～9Eの共鳴角度に基づき検量線を作成し、作成した検量線を用いて現在の検出種の濃度を演算しているので、極めて正確にリアルタイム分析を行うことができる。なお、上記の各ステップB1～B7についても、上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。各ステップを同時実行する場合には、試料中の検出種が結合物質10に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

#### 【0068】(B) その他

以上、本発明の実施の形態について説明したが、上述の実施形態はあくまでも本発明の一実施形態であり、本発明の実施形態がこれに限定されるものではない。例えば、上述の実施形態では角度スキャンによる分析を行っているが、波長スキャンによる分析も勿論可能である。この場合は、光源22からセンサチップ1に一定の入射角度で白色光を分光器（図示略）で波長毎に分光して照射し、その反射光を光検出器23で検出すればよい。この場合は共鳴角度ではなく共鳴波長を表面プラズモン共鳴現象に相関するシグナルとして用いることができる。

【0069】具体的には、図3(b)に示すように予め計測された標準条件下における各標準スポット9A～9

Eの共鳴波長を $\lambda_{OA}$ ,  $\lambda_{OB}$ ,  $\lambda_{OC}$ ,  $\lambda_{OD}$ ,  $\lambda_{OE}$ とし、今回検出された各標準スポット9A～9Eの共鳴波長を $\lambda_A$ ,  $\lambda_B$ ,  $\lambda_C$ ,  $\lambda_D$ ,  $\lambda_E$ とすると、 $(\lambda_{OA}, \lambda_A), \dots, (\lambda_{OE}, \lambda_E)$ の5組のデータが得られる。これらのデータから適当な近似式により標準条件下における共鳴波長と今回検出された共鳴波長との換算式 $f(\lambda)$ を求めることできる。この換算式 $f(\lambda)$ を利用することにより、未知のスポットにおいて標準条件下で検出されるべき共鳴角度 $\lambda_{ox}$ は、そのスポットで今回検出された共鳴波長 $\lambda_x$ を用いて次式(数5)で求めることができる。

## 【0070】

$$[\text{数5}] \lambda_{ox} = f^{-1}(\lambda_x)$$

したがって、この式に今回検出された各スポット8の共鳴波長を当てはめることにより、検出された各スポット8の共鳴波長を標準条件下において各スポット8で検出されるべき共鳴波長に補正することができる。

【0071】また、各標準スポット9A～9Eが示す検出種の濃度を $C_A$ ,  $C_B$ ,  $C_C$ ,  $C_D$ ,  $C_E$ とし、今回検出された各標準スポット9A～9Eの共鳴波長を $\lambda_A$ ,  $\lambda_B$ ,  $\lambda_C$ ,  $\lambda_D$ ,  $\lambda_E$ とすると、これら $(C_A, \lambda_A), \dots, (C_E, \lambda_E)$ の5組のデータから、適当な近似式により今回検出される共鳴角度と検出種の濃度との換算式 $f(C, \lambda)$ が求められる。この換算式 $f(C, \lambda)$ を利用することにより、未知のスポットに存在する検出種の濃度 $C_x$ は、そのスポットで今回検出された共鳴波長 $\lambda_x$ を用いて次式(数6)で求めることができる。

## 【0072】

$$[\text{数6}] C_x = f^{-1}(C, \lambda_x)$$

したがって、この式に今回検出された各スポット8の共鳴波長を当てはめることにより、各スポット8に対応する検出種の濃度をリアルタイムに算出することができる。

【0073】また、本発明を適用可能なセンサチップは上述の実施形態のものに限定されない。上述の実施形態では複数の標準スポットが設けられたセンサチップを使用しているが、図8に示すように標準スポット32が一つのみ設けられたセンサチップ31を用いても本発明を実施することができる。この場合、センサチップ31の傾きによる誤差の補正是、今回標準スポット32で検出されたシグナルと、標準条件下において標準スポット32で検出される標準シグナル(共鳴角度或いは共鳴波長)との比較に基づいて、今回結合物質34が固定されたスポット33で検出されたシグナルを補正することにより行う。例えば、今回標準スポット32で検出された共鳴波長と標準条件下で検出される共鳴波長との間に△入の誤差がある場合には、この誤差△入の分だけスポット33で検出された共鳴波長を補正する。また、標準スポット32で検出されるシグナルがスポット33で検出

されるシグナルに一致するときの検出種の濃度情報と、今回スポット33で検出されるシグナルと標準スポット32で得られたシグナルとの対応関係に基づき現在の試料中の検出種の濃度を測定することにより、試料のリアルタイム分析が可能になる。

【0074】また、標準スポットを複数設ける場合、上述の実施形態のように各標準スポットが独立したものではなく、図9に示すセンサチップ51のように単一の連続した領域(標準領域)52内において段階的にピッチを変えて回折格子を形成したものでもよい。このような構造によれば、照射光の照射位置に応じて回折格子のピッチが変わるので、そこから検出されるシグナルも異なったものになる。したがって、このセンサチップ51によれば、上述の実施形態にかかるセンサチップと同様に複数のデータに基づく補正やリアルタイム分析を行うことができ、精度の高い補正やリアルタイム分析が可能になる。

【0075】さらに、上述の実施形態では回折格子のピッチをパラメータとして同一条件下で異なるシグナルを得ることを可能にしているが、回折格子の溝深さ、金属層の厚み及び材質のうち少なくとも一つのパラメータを変更することによっても同一条件下で異なるシグナルを得ることができる。さらに、上述の実施形態では、従来の一般的な構造の回折格子型センサチップを用いた場合について説明したが、本発明は他の様々な構造の回折格子型センサチップを用いても実施することができる。すなわち、試料と接するセンサ面と、センサ面の近傍に設けられ表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、センサ面の近傍に設けられ照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子とを備えたセンサチップであればよい。

【0076】以上例を挙げたように、本発明はその趣旨を逸脱しない範囲で種々変形して実施することができる。

## 【0077】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明の第1の分析方法及び分析装置によれば、表面プラズモン共鳴センサチップが垂直方向や水平面内で傾いている場合でも、特定領域において所定の標準条件下において得られた標準シグナルと今回検出されたシグナルとの比較に基づいて、反応領域に対応するシグナルが補正されるので、傾きによる誤差の影響をうけることなく試料中の検出種の濃度を正確に分析することができる利点がある。

【0078】また、本発明の第2の分析方法及び分析装置によれば、今回検出された反応領域に対応するシグナルが示す試料中の検出種の濃度が、今回検出された特定領域に対応するシグナルを利用して演算されるので、濃度既知の試料を用意することなく簡便に試料のリアルタイム分析を行うことができる利点がある。さらに、本発明の表面プラズモン共鳴センサチップによれば、標準領

域を特定領域として利用することで、第1の分析方法及び分析装置においては、反応領域に対応するシグナルの誤差を高い精度で補正することができ、第2の分析方法及び分析装置においては、各照射領域からのシグナルに基づき検量線の作成を可能にして正確なリアルタイム分析が可能になるという利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図2】図1のセンサチップに結合物質を固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図3】(a)は図1のセンサチップにおける角度スキャン時の試料中の検出種の濃度と共鳴角度と回折格子のピッチとの関係を示す図であり、(b)は図1のセンサチップにおける角度スキャン時の試料中の検出種の濃度と共鳴波長と回折格子のピッチとの関係を示す図である。

【図4】図1のセンサチップの製造方法の一例を示す模式的な斜視図であり、(a)～(c)の順に製造手順を示している。

【図5】本発明の一実施形態にかかる分析装置の構成を示す模式的な模式図である。

【図6】図5の装置を用いた試料の分析手順を示すフローチャートである。

【図7】図5の装置を用いた試料の分析手順を示すフローチャートである。

【図8】本発明を適用可能なセンサチップの構成の一例を示す模式的な斜視図である。

【図9】本発明を適用可能なセンサチップの構成の一例を示す模式的な斜視図である。

【図10】従来のセンサチップの構成を示す模式的な斜

視図である。

【図11】従来のセンサチップの特性を示す分散関係図である。

【図12】従来のセンサチップの課題を説明するための図であり、(a)はセンサチップが垂直方向に傾いた状態を示す側面図、(b)はそのときの分散関係図である。

【図13】従来のセンサチップの課題を説明するための図であり、(a)はセンサチップが水平面内での傾いた状態を示す平面図、(b)はそのときの分散関係図である。

【符号の説明】

1, 31, 41, 51 センサチップ(表面プラズモン共鳴センサチップ)

1a センサ面

2 基体

3 金属層

4, 5A～5E 凹凸形状

6, 7A～7E 回折格子

8, 33 スポット(反応領域)

9A～9E, 32 標準スポット(標準領域、特定領域)

10, 34, 44 結合物質

20 分析装置

21 ホルダ

21a 流路

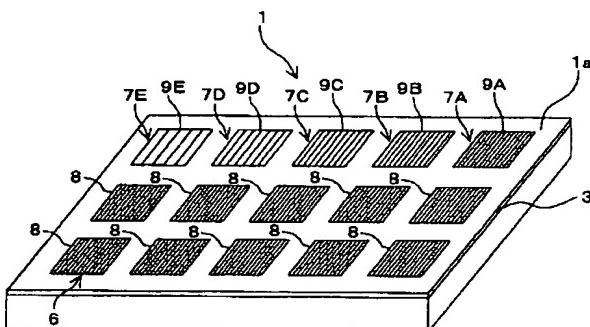
22 光源

23 光検出器

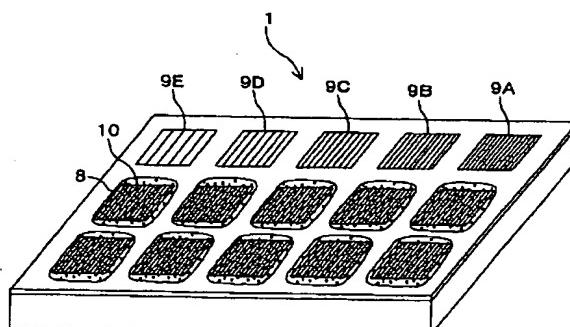
24 分析部

43, 52 標準領域

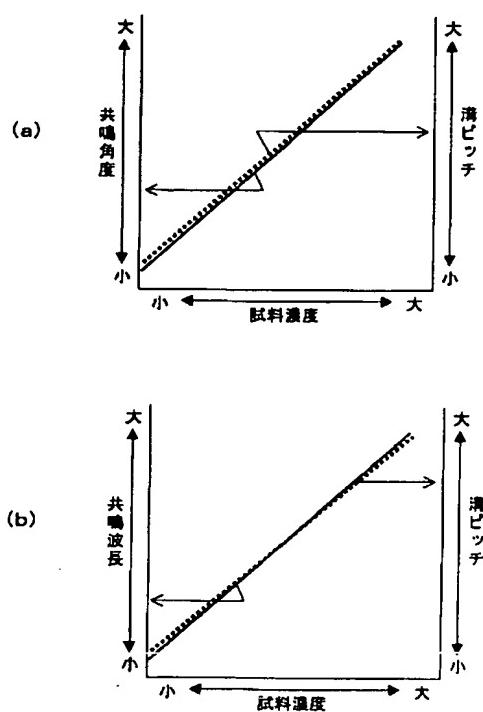
【図1】



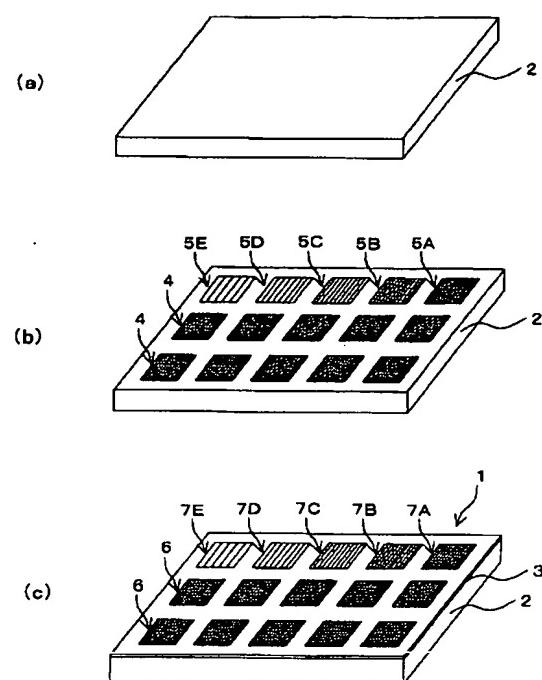
【図2】



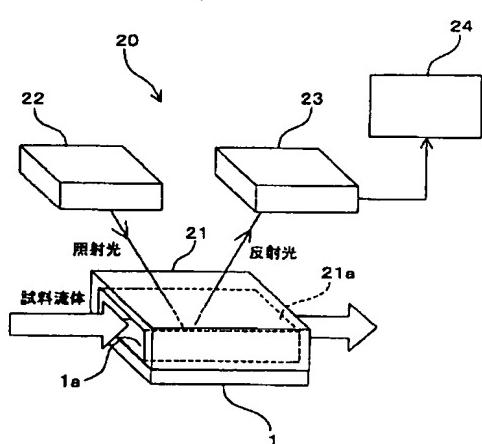
【図3】



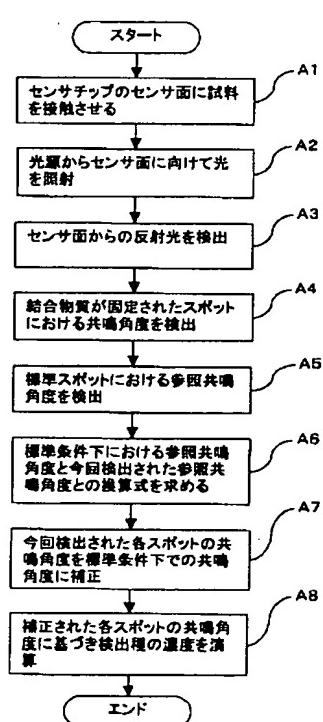
【図4】



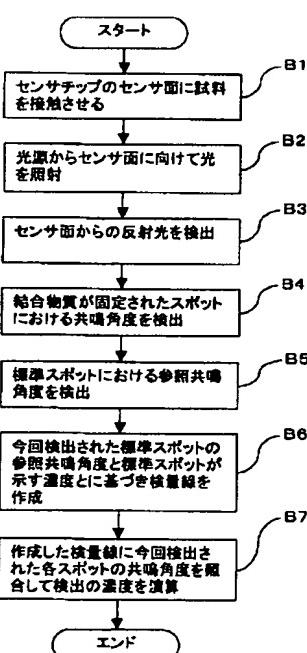
【図5】



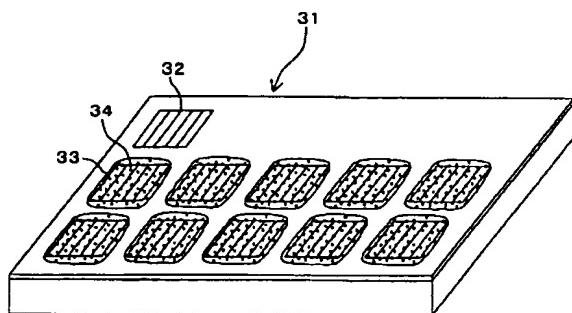
【図6】



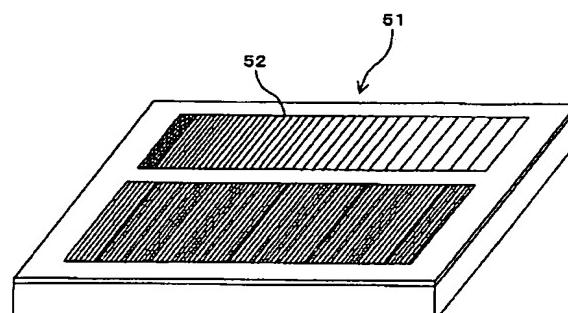
【図7】



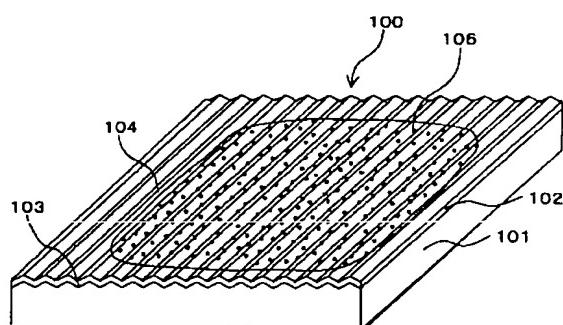
【図8】



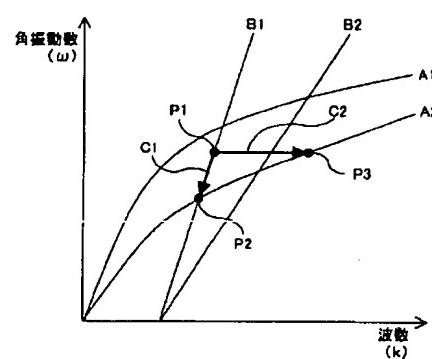
【図9】



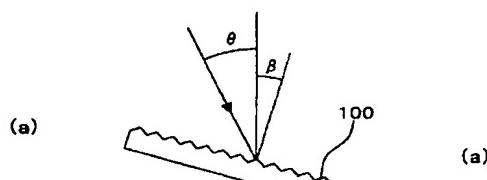
【図10】



【図11】



【図12】



【図13】

